

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Preparación del inóculo

Inocular en un matraz de 200 ml caldo CASO con 3 asadas de *Escherichia coli*. ATCC 35218 y dejar incubar a 35 °C por 24 h.

### 5.2. Inoculación de las semillas de alfalfa

Agregar al matraz descrito en el paso anterior las semillas de alfalfa (aproximadamente 200 g). Añadir 500ml de caldo estéril hasta asegurarse de que las semillas queden cubiertas completamente. Agitar vigorosamente y dejarlas en contacto aproximadamente por un minuto. Decantar el caldo y recuperar las semillas con ayuda de una malla de diámetro adecuado (Scouten y Beuchat, 2002).



**Figura 1.** Preparación de las semillas de alfalfa inoculadas

Una vez extendidas las semillas, dejarlas secar en la campana de flujo laminar por aproximadamente 28h. Almacenar las semillas en bolsas de plástico (*Nasco Whirl-Pack*) a una temperatura entre 4-5 °C. (No sobrepasar una semana sin que sean utilizadas). (Scouten y Beuchat, 2002).

### 5.3. Tratamiento con luz ultravioleta de onda corta (UVC)

Pesar en 10 cajas petri 5.5 g de semillas de alfalfa inoculadas. Cinco cajas Petri recibirán un tratamiento superficial con una lámpara de haz colimado (Sterilaire Lamp, UVP, Modelo XX-15s) de luz ultravioleta por 0, 2, 4, 8, y 16 min, respectivamente, mientras que las otras 5 cajas Petri se expondrán a la lámpara por los mismos tiempos, con la diferencia de que a la mitad del tiempo total de tratamiento, las semillas se retiran y se agitan por 20 s, y después se regresan a la lámpara para terminar su tratamiento. La intensidad de la lámpara es de  $900\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .



**Figura 2.** Lámpara de luz UVC (Sterilaire Lamp, UVP, Modelo XX-15s)



**Figura 3.** Preparación de la muestra 5.5g de semillas de alfalfa

Las semillas deben sembrarse inmediatamente después de recibir el tratamiento con luz UVC.

Las dosis correspondientes a los tiempos de exposición a la luz UVC se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla I.** Relación tiempo-dosis en el tratamiento con luz UVC

Tiempo (min)	Tiempo (s)	Intensidad ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ )	Dosis ( $\text{W}/\text{m}^2$ )	Dosis ( $\text{J}/\text{m}^2$ )
0	0	900	9	0
2	120	900	9	1080
4	240	900	9	2160
6	360	900	9	3240
8	480	900	9	4320
16	960	900	9	8640

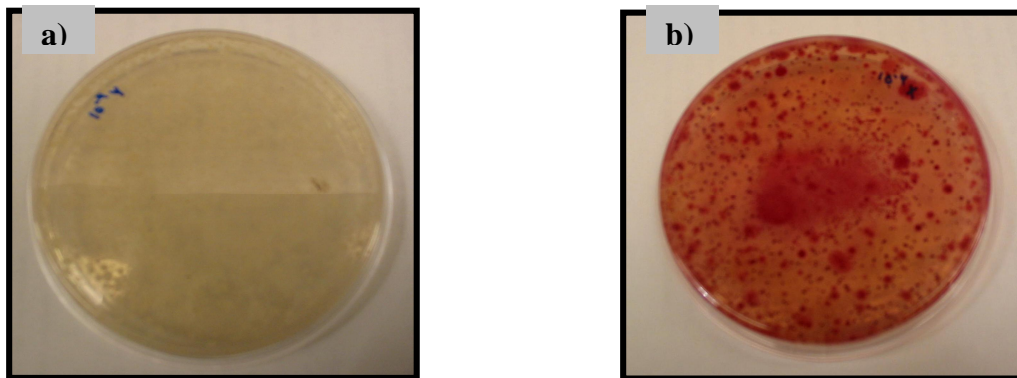
#### 5.4. Análisis microbiológico

Hacer diluciones decimales 0.1% (1 g de semillas de alfalfa + 9 mL de agua peptonada estéril), hasta llegar a la cuarta dilución. Llevar a cabo la siembra en profundidad empleando Agar VRB (Violet red bile) y Agar Nutritivo estériles (15min a 121°C). El primero es un Agar selectivo para la determinación y enumeración de coniformes totales, mientras que el segundo reporta un conteo total de mesófilos aerobios presentes en la semilla. Incubar a 37 °C en Agar VRB por 24 h, y a 37 °C en Agar Nutritivo por 48 h. Todas las siembras deben hacerse por duplicado.



**Figura 4.** Equipo de laboratorio utilizado para el Análisis microbiológico de las semillas de alfalfa inoculadas.

Realizar los recuentos siguiendo la cuenta estándar (CE).

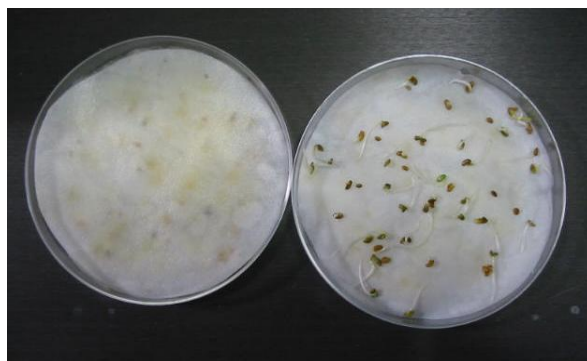


**Figura 5.** Siembras en los medios de cultivo. a) Agar Nutritivo; b) Agar VRB

### 5.5. Germinación de las semillas de alfalfa.

Se calcula el porcentaje de germinación de las semillas de alfalfa para cada tiempo y para cada tipo de exposición, es decir, con y sin agitación.

Colocar 100 semillas de alfalfa (inoculadas y sin inocular) en una caja Petri estéril con papel filtro humedecido. Mantenerlas a 25 °C durante 48 h hasta que germinen por completo, cuidando que el papel se mantenga siempre húmedo. Calcular el porcentaje de germinación correspondiente a cada condición. (Sharma y Demirci, 2003).



**Figura 6.** Germinación de las semillas de alfalfa.

## 5.6. Análisis estadístico.

Todos los experimentos se sembraron por duplicado, teniendo por lo menos cuatro corridas de los mismos. Los resultados obtenidos se reportan como la media de las reducciones microbianas, con la desviación estándar correspondiente.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola cola, con el programa MINITAB 12 para Windows, con la finalidad de valorar las diferencias entre los tiempos de tratamiento, así como en la aplicación o no de agitación de las semillas a la mitad de los mismos (Apéndices B y C).

## 5.7. Tratamiento de luz UVC combinado con soluciones de hipoclorito de calcio.

Se calculó el cloro libre del hipoclorito de calcio empleado con el kit Taylor. Chlorine Test (K-1401), obteniéndose que cada  $0.1\text{g l}^{-1}$  equivalían a 50ppm. 5.5g de semillas de alfalfa se remojaron en 15ml de solución de hipoclorito de calcio de distintas concentraciones durante 10min, como se muestra en el plan de investigación, hasta obtener la adecuada (1000ppm).



Figura 7. Taylor. Chlorine Test. (K-1401)

Los tratamientos se hicieron con la aplicación de 4min de luz UVC, siguiendo las siguientes variantes:

- Luz UVC (4min) + solución de hipoclorito de calcio (10 min)
- Solución de hipoclorito de calcio (10min) + luz UVC (4min)
- Aplicación simultánea de la luz UVC (4min) a los 5.5g de semillas + 15ml de la solución; una vez transcurridos los 4min de exposición a la luz UVC, se cumplieron los 6min restantes del remojo en la solución y se procedió a enjuagar y a sembrar.

Las semillas fueron enjuagadas con 15ml de agua destilada estéril, después del remojo en la solución de hipoclorito, para cortar el efecto del cloro libre.

Una vez aplicados los tratamientos, se siguió la metodología presentada en el capítulo 5.4 para el análisis microbiológico, con la excepción de que las muestras se sembraron únicamente en Agar VRB.